

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA

Ceruloplasmina, técnica modificada

Por los autores:

Lic. *Emilio Grueiro Azcano*,* Dra. *Susana Esquenazi Mitrani*,** Téc. *Vladimir Grueiro Yen*** y Téc. *Gelsys Echevarría Madan*****

Grueiro Azcano, E. Ceruloplasmina, técnica modificada.

El incremento y el perfeccionamiento del arsenal tecnológico que requiere el laboratorio clínico es una necesidad imperiosa, como ayuda al diagnóstico, al pronóstico, a los monitores de las enfermedades, etcétera. La determinación de la ceruloplasmina es de suma importancia en diversas enfermedades y entre éstas las neoplasias malignas. El cobre y la ceruloplasmina ofrecen resultados que se correlacionan. Esto nos permite sustituir la determinación del cobre por el de la ceruloplasmina, la que está al alcance de cualquier laboratorio. La técnica de Ravin fue modificada por nosotros y este trabajo consiste en demostrar las ventajas de esta modificación. Se demostró que cambiando el pH del amortiguador de 5,5 a 5,0 baja el 50% del costo y hace posible su ejecución mecanizada. A la técnica modificada se le realizaron estudios de control de calidad, entre éstos, confiabilidad por estudios interlaboratorios, con resultados satisfactorios.

INTRODUCCION

El incremento y perfeccionamiento del arsenal tecnológico que requiere el laboratorio clínico es una necesidad imperiosa, como ayuda al diagnóstico, pronóstico, monitoreo de las enfermedades, etcétera.

La determinación de la ceruloplasmina es de suma importancia en diversas enfermedades¹⁻⁵ y entre éstas las neoplasias malignas.⁶⁻¹³

El cobre y la ceruloplasmina ofrecen resultados que se correlacionan.^{14,15} Esto nos permite sustituir la determinación del cobre por el de la ceruloplasmina, la que está al alcance de cualquier laboratorio.

La técnica de Ravin^{16,17} fue modificada por nosotros y este trabajo consiste en demostrar las ventajas de esta modificación. Las modificaciones se efectuaron con el objetivo de simplificar la técnica, bajar el costo y hacer posible que se realice con procedimientos mecanizados.

* Licenciado en química, laboratorio de análisis bioquímicos clínicos. INOR.

** Doctor en Ciencias Físicoquímicas, Jefe del laboratorio de análisis bioquímicos clínicos. INOR.

*** Auxiliar técnico del laboratorio de hematología del hospital pediátrico "Pedro Borrás Astorga".

**** Técnico del laboratorio de análisis bioquímicos clínicos. INOR.

Se investigaron los siguientes aspectos:

1. Obtención de un blanco único pues la técnica de Ravin requiere un blanco para cada muestra.
2. Estudio de las variables que componen la técnica modificada, para reducir tiempo de ejecución y gastos de reactivos.
3. Comportamiento de la técnica modificada, según estudios estadísticos.
 - a) Comparación de medias de ambas técnicas (la de Ravin y la modificada) por la prueba de la t de Student.¹⁸
 - b) Precisión por repetibilidad¹⁹ de la técnica modificada.
 - c) Confiabilidad por estudios interlaboratorios¹⁹ de la técnica modificada.
 - d) Envejecimiento de la muestra.
 - e) Valores normales.

MATERIAL Y METODO

Muestra: 100 sueros de donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana y un *pool* de estos sueros, hombres y mujeres adultos.

25 sueros de donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana, mujeres adultas.

30 sueros de pacientes del INOR y un *pool* de estos sueros, hombres y mujeres adultos.

Método de Ravin del cual se partió

Fundamento: La ceruloplasmina puede funcionar *in vitro* como una oxidasa. La extensión de la conversión del sustrato clorhidrato de p-fenilendiamina en un producto de oxidación púrpura, ésta es medida espectrofotométricamente y la absorbancia es convertida en mg de ceruloplasmina por 100 ml de suero, por un factor de conversión derivado de una preparación altamente purificada de ceruloplasmina.

Reactivo: Diclorhidrato de p-fenilendiamina al 0,5%.

Amortiguador de acetato, pH 5,5 y 0,4 M.

Disolución de azida sódica al 0,5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Obtención de un blanco único.

Se estudió la variación del pH y se mantienen constantes las demás variables de la técnica de Ravin.

Los amortiguadores se prepararon a partir de una disolución de acetato de sodio de 25 gramos por 0,9 litros, al cual se le agregó ácido acético hasta obtener los pH deseados y el volumen de un litro.

Técnica modificada

Muestra

Blanco único

↓
8 ml de amortiguador pH 5,0
1 ml sustrato de Cl-p-fenilendiamina 0,5%
agitar

↓
Incubar 1 hora a 37°C a baño de María con
abundante agua y oscuro.

↓
Añadir 1 ml de azida sódica al 0,5% (para
detener la reacción) agitar y poner ½ hora
a 4-8°C.

↓
Leer las absorbancias a 530 nm de cada
muestra contra el blanco único y multiplicarlo
por 87,5; se darán los resultados en miligramos
por ciento.

Procedimiento

Muestra

Blanco

0,1 ml suero

0,1 ml suero

1 ml azida sódica al 95%

↓
8 ml amortiguador pH 5,5
agitar

↓
1 ml de sustrato 0,5% de
Clorhidrato de p-fenilendiamina

↓
Incubar 1 hora a 37°C a baño de María
con abundante agua y en oscuridad

↓
1 ml azida sódica al 0,5% a las
muestras (para detener la reacción)
agitar, ponerlo ½ hora a 4-8°C.

↓
Leer, las absorbancias a 530 nm de cada
muestra, contra su blanco y el resultado
multiplicarlo por 87,5. El valor obtenido
es un miligramo por ciento.

El factor de 87,5 se obtuvo (por Ravin) utilizando como muestra una
concentración conocida de ceruloplasmina cristalizada (pura).

Las muestras se tomaron de un *pool* de 100 sueros humanos sanos. Las determinaciones de ceruloplasmina a distintos pH, se efectuaron simultáneamente y las lecturas de la absorbancia fueron contra un blanco de agua destilada.

El cuadro I y el gráfico 1 nos muestran cómo a medida que aumenta el pH, la reacción de oxidación del diclorhidrato de p-fenilendiamina aumenta con incremento de la intensidad del color.

Con un pH 4,0 la reacción no se produce y con un pH 4,5 es muy baja, a partir de un pH 5,0 la reacción se produce y da un valor de absorbancia más adecuado.

El valor obtenido con un pH 5,0 es similar a los de pH 5,5 y 6,0 si a éstos últimos se les restara el valor de la absorbancia del blanco. A pH mayor de 5,0 el blanco toma color y este color es independiente de la muestra. Y si este blanco tuviera muestra (suero) este color estaría influido por la reacción de oxidación del diclorhidrato de p-fenilendiamina de otras sustancias no inhibidas por la azida sódica, por lo que se hace necesario en cada muestra utilizar un blanco control con suero para restar el incremento de la absorbancia, que sería diferente en cada muestra.

Con un pH 5,0 sólo la ceruloplasmina oxida el diclorhidrato de p-fenilendiamina por lo que es posible usar un blanco único (sin suero).

2. Estudio de las variables que componen la técnica modificada. Muestra *pool* de 100 sueros humanos normales.

a) Variaciones del sustrato de diclorhidrato de p-fenilendiamina.

Se utilizó un *pool* de suero humano normal de 100 donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana. Se realizaron 10 determinaciones con 0,2 ml de sustrato; 10 con 0,3 ... 10 con 1,0 ml

CUADRO I

pH	No. de determinaciones		Medias cp- mg %
4,0	20	muestra	0,0
		blanco (con suero)	0,0
		blanco (sin suero)	0,0
4,5	20	muestra	9,0
		blanco (con suero)	0,0
		blanco (sin suero)	0,0
5,0	20	muestra	45,5
		blanco (con suero)	0,15
		blanco (sin suero)	0,10
5,5	20	muestra	54,0
		blanco (con suero)	9,3
		blanco (sin suero)	8,6
6,0	20	muestra	59,6
		blanco (con suero)	14,7
		blanco (sin suero)	14,0

de sustrato de 0,5%, se obtuvieron las medidas de las concentraciones de ceruloplasmina, las cuales fueron 36,0 mg %; a partir de 0,3 mi de sustrato los valores oscilaron alrededor de 42 mg % de ceruloplasmina. Con estos valores se confeccionó el gráfico 2. Se encontró que el incremento del sustrato a partir de 0,3 mi no afecta el resultado de la determinación.

b) Variaciones del tiempo de incubación.

Se colocaron 40 tubos de ensayos que contenían los reactivos y suero de un pool de suero humano normal a 37°C y cada 15 minutos se extrajeron 10 tubos a los cuales se les añadió azida sódica al 0,5% colocándose a 4-8°C y leyéndose a la media hora. Las medias ofrecieron los siguientes valores de ceruloplasmina 6,9; 14,5; 26,0 y 38,0 mg %. Con estos valores y el tiempo, se confeccionó el gráfico 3. Los resultados muestran que el tiempo de incubación es una variable que interviene sensiblemente en el resultado de la concentración de ceruloplasmina.

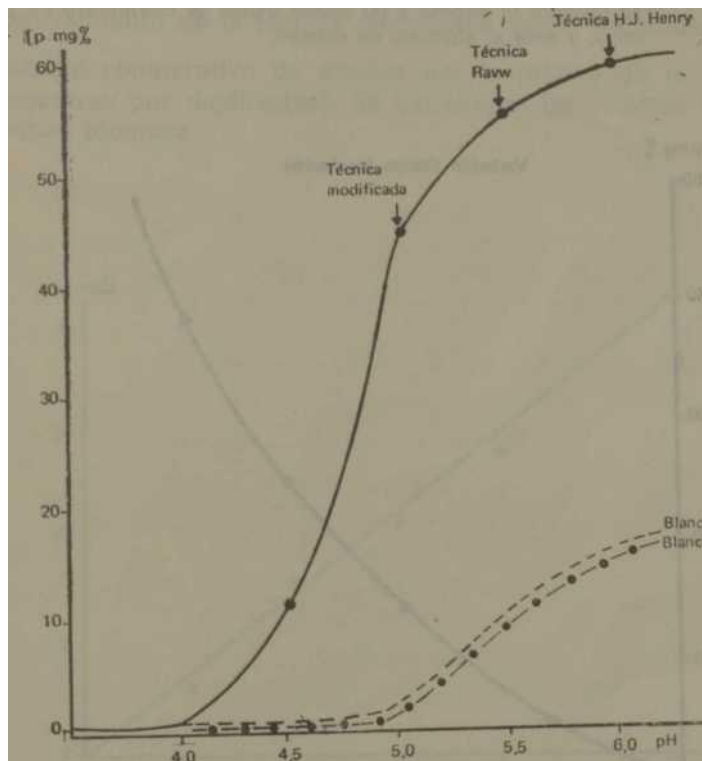


Gráfico 1. Muestra las medias de los valores de ceruloplasmina obtenidas en un grupo de 20 determinaciones de un pool de suero humano normal a distintos pH, se señalan los pH con los cuales se efectúa la técnica de Ravin. Ravin modificada por nosotros y Ravin modificada según H. J. Henry; así como los valores del blanco con suero y el blanco sin suero.

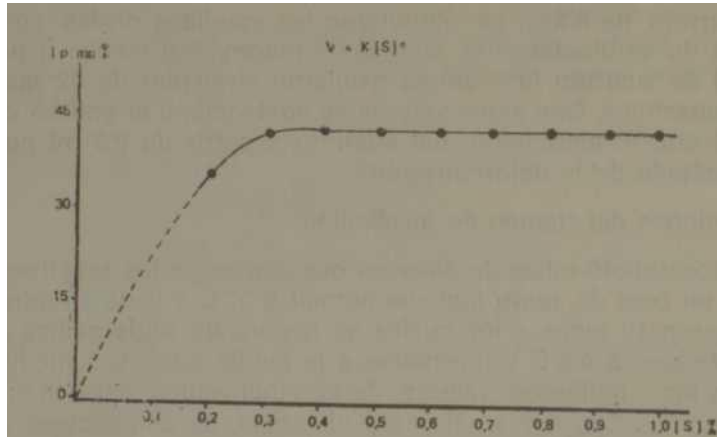


Gráfico 2. Muestra que es una reacción de orden cero con respecto al sustrato a partir de 0,3%. La concentración del sustrato no afectó el resultado de las muestras a partir de 0,3%. Esto se debe a que en un momento del procedimiento se le añade a la muestra azida sódica, con lo que se inactiva la enzima y no puede oxidar al clorhidrato de p-fenilendia-mina, y está el sustrato en exceso.

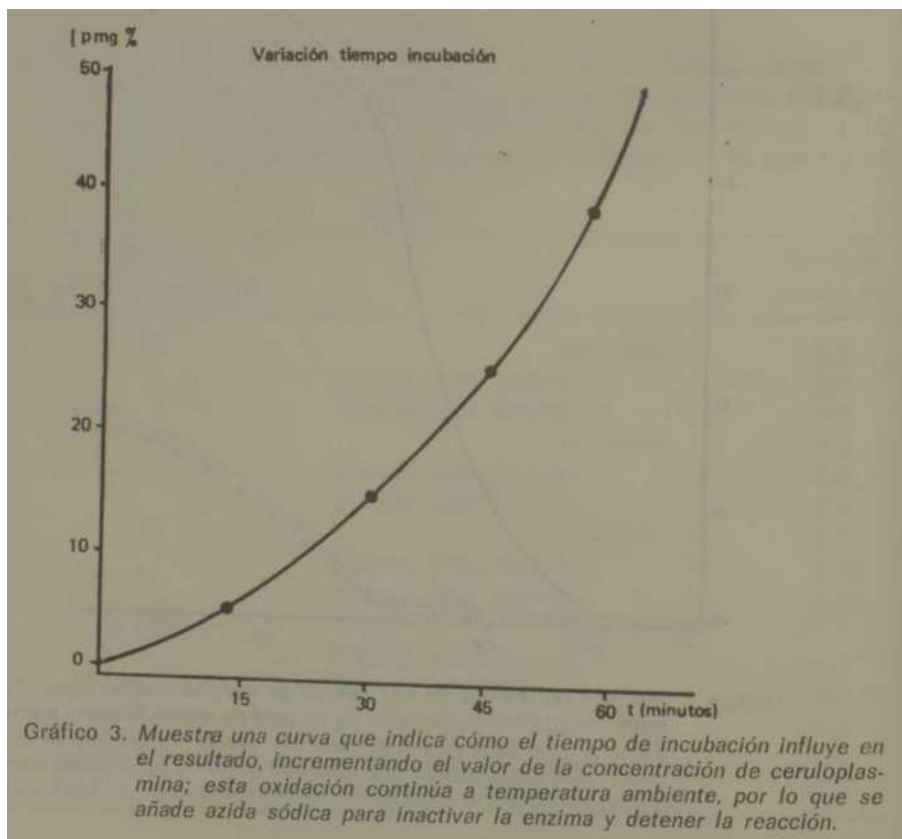


Gráfico 3. Muestra una curva que indica cómo el tiempo de incubación influye en el resultado, incrementando el valor de la concentración de ceruloplasmina; esta oxidación continúa a temperatura ambiente, por lo que se añade azida sódica para inactivar la enzima y detener la reacción.

c) Variaciones de la cantidad de muestra.

Se realizaron de un *pool* de suero humano, 10 determinaciones de ceruloplasmina con cada uno de los siguientes volúmenes de muestra; 25; 50; 75; 100 y 150 μ l. Se obtuvieron las siguientes concentraciones de ceruloplasmina; 6,5; 16,2; 22,6; 28,0 y 43,0 mg %. Con estos valores y la cantidad de muestra se confeccionó el gráfico 4. El gráfico señala que hay una relación lineal entre la cantidad de muestra y la concentración de ceruloplasmina.

d) Variaciones de la temperatura.

Se realizaron con un mismo *pool* de sueros y en el día, 10 determinaciones de ceruloplasmina a cada una de las siguientes temperaturas 30°C; 37°C; 45°C y 56°C; obteniéndose 34,0; 55,0; 83,0 y 124,0 mg % de ceruloplasmina.

Con estos datos se confeccionó el gráfico 5. Al igual que con el tiempo de incubación, la temperatura interviene sensiblemente en el valor final de la concentración de ceruloplasmina.

3. Comportamiento de la técnica modificada según estudios estadísticos.

a) Estudio comparativo de medias por la prueba de la t de Student (muestras por duplicados). Se estudiaron las mismas muestras por ambas técnicas.

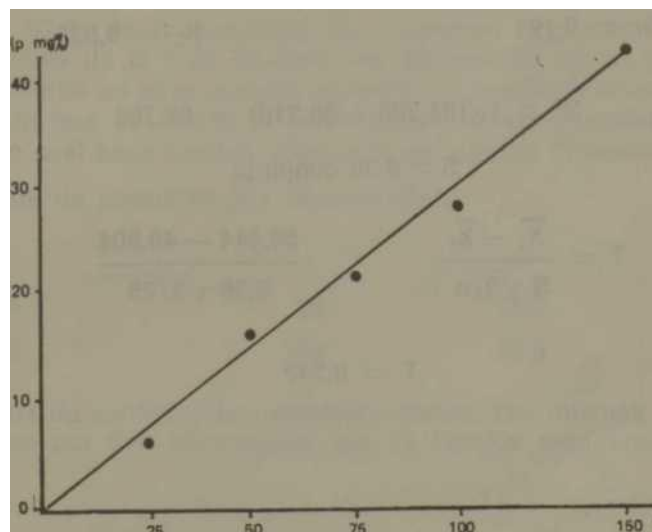


Gráfico 4. Muestra que hay relación lineal, lo cual indica que hay una proporción directa entre la cantidad de muestra y el valor de la concentración de la ceruloplasmina. Se puede considerar más conveniente hacer las determinaciones con 0,1 ml de muestra (suero) ya que con este volumen se logra una precisión adecuada.

A

B

Técnica de Ravin

- a) 0,1 ml de suero.
- b) pH del amortiguador 5,5.
- c) Cada muestra con su control.
- d) Baño de María 1 hora.
- e) Enfriamiento 30 minutos.
- f) Lectura multiplicada por 87,5

Técnica modificada

- a) 0,05 ml de suero (todos los reactivos a la mitad).
- b) Buffer 5,5.
- c) Blanco único para todas las muestras sin suero.
- d) Baño de María 35 minutos.
- e) Enfriamiento 5 minutos en agua (cubeta 1 cm).
- f) Lectura multiplicada por 175 (cubeta 1 cm).

$$n = 25$$
$$A = \sum X_1 = 1245,1 \quad B = \sum X_2 = 1261,1$$
$$X_1 = 49,8 \quad X_2 = 50,4$$
$$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1} \quad \text{Varianza}$$
$$S_1^2 = \frac{2028,2}{24} = 84,508 \quad S_2^2 = \frac{2181,85}{24}$$
$$S_1 = 9,193 \quad S_2 = 9,535$$
$$S^2 = \frac{1}{2} (84,508 + 90,910) = 87,709$$
$$S = 9,36 \text{ conjunta}$$
$$T = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{S \sqrt{2/n}} = \frac{50,444 - 49,804}{9,36 \sqrt{2/25}}$$
$$T = 0,242$$

IP=9 1

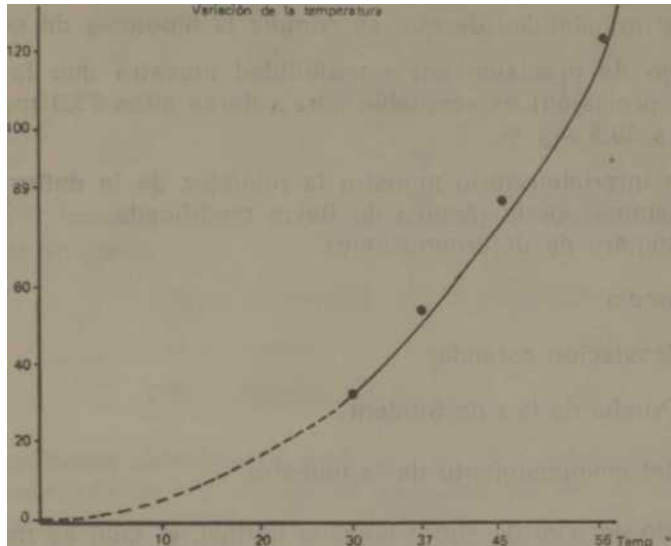


Gráfico 5. Muestra una curva exponencial que indica la influencia de la temperatura en el valor de la concentración de la ceruloplasmina, ya que ésta es una enzima (un catalizador) y la temperatura influye en la velocidad de la reacción.

De la tabla: $t(99,48) = 2,722$

Por tanto, no existe evidencia de que no se cumpla la hipótesis de que $x_1 = x_2$, con 99 % de probabilidad. Se muestran operaciones matemáticas de la prueba de la t de Student, por lo sencillo de su ejecución. El resultado obtenido en este estudio muestra las modificaciones que admite la técnica, sin que se afecte la confiabilidad y reproducibilidad de sus resultados, lo cual hace posible efectuarla en autolab (mecanizada).

a) Estudios de precisión por repetibilidad.

	n	m	D E
Pool A	25	75,3	3,1
Pool B	100	39,5	4,3

b) Estudios de confiabilidad interlaboratorios. Las mismas muestras estudiadas por dos laboratorios con la técnica modificada.

	n	m	D E	t s	
Lab. clínico	30	59,5	12,5	0,04	0,01
" ABC	30	58,1	11,3		
Lab. clínico	25	50,4	10,9	0,07	0,01
" ABC	25	48,3	9,3		

Como se observa en las alfas de las pruebas de la t de Student, hay un 99 % de probabilidad de que se cumpla la hipótesis de que $x_1 = x_2$.

El estudio de precisión por repetibilidad muestra que la desviación estándar (la precisión) es aceptable para valores altos 75,3 mg % y valores normales 39,5 mg %.

El estudio interlaboratorio muestra la robustez de la determinación de la ceruloplasmina por la técnica de Ravin modificada, n = número de determinaciones.

m = media.

DE = desviación estándar.

ts = Prueba de la t de Student.

3. Estudio del envejecimiento de la muestra.

Se estudió un *pool* de suero humano normal, el cual se mantuvo a la temperatura de 4-8 °C. En los días 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 16 se efectuaron 10 determinaciones de ceruloplasmina en cada uno de estos días y se obtuvieron los siguientes valores medios: 43,5; 42,0; 43,0; 41,0; 38,0 y 30,0. Con estos valores se confeccionó el gráfico 6.

4. Valores normales.

a) Muestra: 100 sueros de donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana, hombres y mujeres adultos. Con la técnica modificada los resultados en miligramos por ciento.

n	m	DE	Rango	Coef. de variación
100	40,7	+6,3	34,4-47,0	15

b) Muestra: 25 sueros de donantes del Banco Provincial de Ciudad de La Habana, mujeres adultas. Con la técnica modificada.

n	m	DE	Rango	Coef. de variación
25	38,5	6,4	32,1-44,9	16

c) Muestra: 25 sueros de donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana, mujeres adultas con la técnica de Ravin del trabajo de tesis de grado de *Joseph Kibongui*.¹⁴

	n	m	DE	Coef. de variación
Ravin reporta	—	32,2	± 9,8	30
Kibongui	25	33,3	±11,6	27

d) Muestra: 31 mujeres sanas.²⁰

n	m	DE	Rango	Coef. de variación
31	34,8	5,6	29,2-40,4	16
22	35,0	5,0	30-40	

*Yunice*²⁰ demuestra que la ceruloplasmina es significativamente más alta en las mujeres.

n = número de determinaciones, m =
media.

DE = desviación estándar.

Los resultados obtenidos al modificar el pH a 5,0 nos permiten rebajar al 50 % los reactivos y el tiempo de ejecución, ya que se utiliza un blanco único y hace posible su ejecución mecanizada. En el libro de *H. J. Henry*²¹ se propone la técnica de Ravin modificada, que se discute por ser este un libro de consulta de mucho uso en Cuba. Esta recomienda las siguientes modificaciones: utilizar un amortiguador de pH 6,0 y un control (blanco) para cada muestra. Realizar las lecturas en un espectrofotómetro con ter- moespaciadores. En cada determinación hacer dos lecturas a los 10 y 40 minutos. Utilizar el colorante violeta de Pontacilo GR (Du Pont) como patrón.

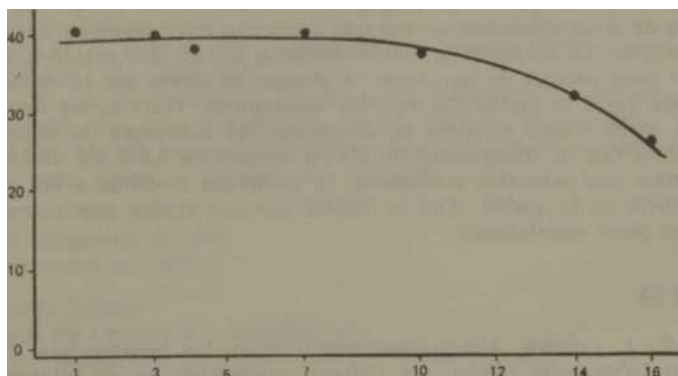


Gráfico 6. Muestra cómo a partir de los 10-12 días de conservada la muestra a 4-8 °C, la disminución de la actividad oxidativa de la ceruloplasmina se hace significativa.

Inconvenientes

No resuelve el problema del blanco único. Se requiere un equipo recomendado por H. J. Henry, lo cual eleva el costo. Hay que hacer dos lecturas y estabilizar la temperatura en el equipo, lo cual complica el procedimiento. Se propone un patrón (colorante) que no toma el color a partir de las condiciones de la técnica.

La única técnica que consideramos que pudiera ser más efectiva es la de inmunodifusión radial simple,^{22,23} pero no se cuenta con el monoantisuero de producción nacional y el uso del juego o del monoantisuero comercial (importados) pues la hacen muy costosa.

SUMMARY

Grueiro Azcano, E. et al. *Ceruloplasmin, modified technique.*

The increment and improvement of technologic arsenal required by clinic laboratory is an imperative need as aid to diagnosis, prognosis and monitoring of diseases, etc. The determination of ceruloplasmin is of great importance for several diseases, and among such diseases for malignant neoplasias. Copper and ceruloplasmin offer correlating results, allowing it to substitute copper determination by ceruloplasmin determination, which is within reach of any laboratory. Ravin technique was modified by us and the object of this paper is to demonstrate the advantages of this modification. It was demonstrated that changing buffer pH from 5,5 to 5,0, cost is reduced in 50% and makes possible its mechanized performance. To the modified technique studies of quality control were performed, among these, reliability by Interlaboratory studies, with satisfactory results.

RÉSUMÉ

Grueiro Azcano, E. et al. *Céruleoplasmine, technique modifiée.*

L'accroissement et le perfectionnement de l'arsenal technologique du laboratoire clinique est indispensable en tant qu'aide au diagnostic, au pronostic, au monitoring des maladies, etc. Le dosage de la céruleoplasmine est très important dans diverses maladies, dont les néoplasies malignes. Le cuivre et la céruleoplasmine offrent des résultats qui sont en corrélation. Ceci nous permet de remplacer le dosage du cuivre par le dosage de la céruleoplasmine, qui est à la portée de tous les laboratoires. Nous avons modifié la technique de Ravin, et ce travail consiste en démontrer les avantages de cette modification. Il a été démontré que le changement du pH du tampon de 5,5 à 5,0 diminue de 50% le coût fait possible son exécution mécanisée. La technique modifiée a été soumise à des études de contrôle de la qualité, dont la fiabilité par des études interlaboratoires; les résultats obtenus étant satisfaisants.

BIBLIOGRAFIA

1. *Sánchez, R.; E. Grueiro:* Alteraciones proteicas en las hepatopatías. Tesis de Especialista en Laboratorio Clínico. La Habana, presentada en el tribunal del hospital "Calixto García", 1981.
2. *Okumura, S.:* Abnormal metabolism of zinc and copper in hepatic disease (Japanese). *Clin Pathol* 19: 63-67, 1971.
3. *Tryshkova, N:* Ceruloplasmin activity and latent saturation of transferrin with iron in infections hepatitis in children. *Pediatr Akush Ginekol* 33: (6), 1972.
4. *Skrvnmik, K.:* Copper and iron content and ceruloplasmin activity in leucocytes and serum of patients with uterine fibromyoma, before after surgery. *Vopr Onkol* 47 (3)- 50, 1975.

5. *Epidemia, L.*: Changes in serum enzymes in chronic pielonephritis. *Latv psr zinat akad vestís* 3: 99-103, 1973.
6. *Herberman, R. B.* Overview on new inmunologic markers for diagnosis of cáncer. *Cáncer* 42: 1590-1600, 1978.
7. *Grueiro, E.; S. Esquenazi; A. Lage*: Análisis multivariado de datos de laboratorio en el diagnóstico de neoplasias malignas, i. Cáncer mamario. *Rev Cub Obstet Ginec* 9: 41-57 enero-marzo, 1983.
8. *Grueiro, E.; S. Esquenazi; A. Lage*: Análisis multivariado de datos de laboratorio en el diagnóstico de neoplasias malignas. II. Cáncer broncopulmonar. *Rev Cub Med* 23: 2, 1984.
9. *Shifrine, M.; G. L. Fisher*: Ceruloplasmin levels in sera from human patients with osteosarcoma. *Cáncer* 38: 244-248, 1976.
10. *Lazar, S.*: Classification of 29 subjets with Hodgkin's disease on the basis of the concentraron of 22 serum antigen. *Ann Biol Clin* 33 (1): 35-40, 1975.
11. *Hughes, N.*: Serum transferrin and ceruloplasmin concentrations in patients with carcinoma, melanoma, sarcoma and cancers of haematopoietic tissues. *J Exp Biol Med Sci* 50 (1): 97-107, 1972.
12. *Packlington, J.*: Electron Spin resinance of ceruloplasmin and γ iron, transferrin in blood of patients with various malignant diseases. *Brit J Cáncer* 36 (3): 369-374, 1977.
13. *Timakine, N. S.*: Copper concentraron the plasma and erythrocytes and ceruloplasmin activity in patients with bronchogenic lung cáncer. *Mater Theor Klin Med*, 1975, citado por *Biol Abst* 86: May 9, 1977.
14. *Kibongui, J. M.; E. Grueiros; S. Esquenazi*: Estudio de los niveles de cobre y cerulo- plasmina en suero de pacientes con tumores de mama. Tesis de grado de Licenciado en bioquímica. La Habana, Universidad de La Habana, 1979.
15. *Cerruthers, M. E.; C. B. Hobbs*: Raised serum copper and ceruloplasmin levels in subjects taking oral contraceptives. *J Clin Pathol* 14: 498, 1966.
16. *Ravin, H. H.*: An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *Lab J Clin Med* July 1961.
17. *Mathew, J. L.*: Medical laboratory technology and clinical pathology, tomado de la edición de 1969. La Habana. Ed. Revolucionaria. Instituto del Libro, 1972.
18. *Snedecor, G. W.; G. IV. Cochran*: Statistical methods. The lbwa state university press. 9na ed. Iowa USA. Ed. Ames, 1978.
19. *Thielmann, K.*: Principios de metodología en bioquímica clínica. La Habana. Ed. Organismos. Instituto Cubano del Libro, 1973.
20. *Yunice, T.*: Influence of age and sex on serum copper and ceruloplasmin levels. *J Gerentol* 9 (3): 1974.
21. *Henry, J. R.; C. D. Cannon; W. J. Winkelman*: Química Clínica, Bases y Técnicas. 2da. ed. Barcelona. Ed. JIMS, 1979.
22. *Mancini, G. B.; A. D. Carbonara*: Inmunochemic&l quantitation of antigen by single radial inmunodifusion. *Inmunochemestry* 22: 35, 1965. 23. 94: 84, 1965.
23. *Fahey, J. L.; E. M. Me Keivey*: Cuantitative determinaron of serum inmunoglobulins in antibody agar plates. *J Inmunol* 94: 84, 1965.

Recibido: 28 de noviembre de 1983
Aprob&do: 28 de enero de 1984

Lic. Emilio Grueiro Azcano
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
Calle 29, esq. F. Vedado.